

ある。これまでに、バレイショ塊茎メタボロミクス研究として、Rossner らの 77 種類⁽²⁾、Dobson らの 59 種類⁽³⁾、Galindo らの 64 種類⁽⁴⁾ の代

謝物分析が報告されている。

Table 1. メタボローム解析プラットフォームにおける同定化合物のリスト

カテゴリー名を太字で示した。括弧内の数字はカテゴリーに含まれる化合物の個数。

(1) GC-MS 分析対象化合物

Amino acid (41)	<i>N</i> -Acetyl-proline	Sucrose	4-methyl-2-oxo-pentanoate
2-Aminoadipate	<i>O</i> -Acetyl-serine	Trehalose	Campesterol
5-Oxo-proline	Ornithine	Xylose	1-Palmitoylglycerol
Agmatine	Phenylalanine	Gluconic acid	β -Sitosterol
Alanine	Pipecolate		Stigmasterol
Aminoadipate	Proline	Energy (8)	Octadecanoic acid
Arginine	Putrescine	Citric acid	Myo-inositol
Asparagine	Pyroglutamic acid	Fumaric acid	Inositol-1-phosphate
Aspartic acid	Serine	α -Ketoglutarate	Palmitic acid
β -Alanine	Threonine	Malic acid	Stearic acid
β -Cyanoalanine	Tryptophane	Succinate	
Betaine	Tyrosine	3-Ureidopropionate	Cofactors (7)
Cysteine	Valine	Glutaric acid	Ascorbic acid
GABA	Urea	Phosphate	Dehydroascorbate
Glutamic acid			Threonate
Glutamine	Carbohydrate (15)	Nucleotide (8)	α -Tocopherol
Glycine	Erythritol	Xanthine	γ -Tocopherol
Glycylglycine	Fructose	Hypoxanthine	Phytonadione
Histidine	Fructose-6-phosphate	Adenine	Pyridoxine chloride
Homoserine	Galactose	Guanine	
Hydroxyproline	Glucose	Guanidine	Xenobiotics (6)
Isoleucine	Glucose-6-phosphate	Urate	glycerol 2-phosphate
Lysine	Glyceric acid	Allantoin	2-Pyrrolidinone
Methionine	Inositol	Uracil	3-Idolylacetoneitrile
<i>N</i> -6-Trimethyllysine	Maltose		Sedoheptulose anhydride
<i>N</i> -Acetyl-glutamine	Ribose	Lipid (11)	Methyl nonadecanoate
<i>N</i> -Acetyl-glycine	Sedoheptulose-7-phosphate	Glycerol 3-phosphate	Ribitol

(2) LC-LIT-TOF/MS 分析対象化合物

Amino acid (20)		Nucleotide (5)	Cofactors (5)
3-Ureidopropionate	Glutathione	Adenosine	Nicotinamide ribonucleotide
Tyramine	Aspartylphenylalanine	1-Methyladenosine	NADH
3-Methoxytyrosine	Leucylproline	2'-Deoxyadenosine	Riboflavin
3-Methyl-2-oxovalerate	Threonylphenylalanine	Adenosine 3'-monophosphate	Pantothenate
4-Methyl-2-oxopentanoate	Glutamylvaline	Adenosine 5'-monophosphate	Pyridoxate
<i>S</i> -Adenosylhomocysteine	γ -Glutamylleucine		
Argininosuccinate	γ -Glutamylcysteine	Lipid (3)	Xenobiotics (4)
<i>N</i> -Acetylmethionine	γ -Glutamylphenylalanine	3-Hydroxytetradecanedioate	5-Formylsalicylate
<i>N</i> -Acetylproline		Choline phosphate	Jasmonic acid
5-Methylthioadenosine	Carbohydrate (2)	Glycerophosphorylcholine	Sinapate
Spermidine	Raffinose		Phaeophorbide
4-Guanidinobutanoate	Maltotetraose		

ネコブセンチュウ病耐性遺伝子組換えバレイショ塊茎のメタボローム解析

遺伝子組換え作物試料として *RKN* 遺伝子を高発現する R16, R34, R38 の 3 系統を供試し、非組換え体 (NT) とのメタボローム比較を行った。それぞれの試料から 80% メタノール抽出画分を調製し GC-MS 分析に供した。検出されたピークの中で、標準物質との同定が可能であったピ

ーク数は 53 であった。さらに、未同定のピークが 67 個検出されたが、組換え体 (R16, R34, R38) と非組換え体 (NT) の間で有意な含量変動が認められたものに関しては、*RKN* 遺伝子導入との関連性を明らかにするために、同定・定量のための分析実験が必要である。

GC-MS 分析により得られた各系統のメタボロームについて主成分分析 (PCA) による多変量解

析で比較した。第1主成分と第2主成分についての散布図をFig. 1に示した(第1主成分の寄与率85.9%, 第2主成分の寄与率6.6%)。非組換え体(R16, R34, R38)と3系統の組換え体(NT)について、特徴のある違いは確認できなかった。

GC-MS分析により同定された各化合物の相対含有量について、組換え体における有意な変動を調べるために、非組換え体との間でt検定による有意差検定を行った(Table 2)。その結果、尿素とピログルタミン酸含量が、R38系統で有意に増加していることが分かった。ただし、この増加はR38系統に限られたものであり、導入された*RKN*遺伝子機能との関連については不明である。ストレス耐性を増強させる転写因子*DREB1a*遺伝子を導入した組換えバレイショ塊茎において含量増加の見られたβ-シアノアラニン(H21年度分担研究報告書)については、R38系統において弱いながらも有意な増加が見

られたが、R16やR34組換え系統と非組換え体NTの間では有意な差が見られず、*RKN*遺伝子導入との関連性は認められなかった。

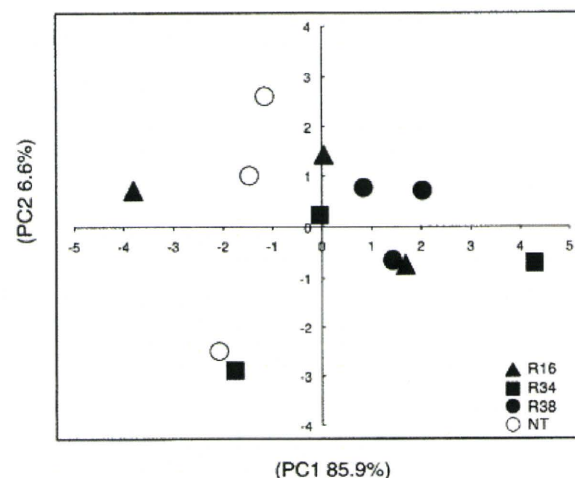


Fig. 1. *RKN*遺伝子組換えバレイショと非組換えバレイショ抽出物のGC-MS分析結果の多変量解析。明確なメタボロームクラスターの分離は確認できなかった。▲; R16, ■; R34, ●; R38, ○; NT。

Table 2. *RKN*遺伝子組換えバレイショ抽出物中で化合物の相対含有量の変動

Compound	R16	R34	R38	Compound	R16	R34	R38	Compound	R16	R34	R38
Urea	-0.11	2.73	6.75	Hexadecanoic acid	0.38	-1.46	0.11	Threonine	-0.37	1.43	-1.38
Pyroglutamic acid	1.47	1.40	4.41	O-Acetyl-serine	-0.57	1.14	-0.10	Galacturonic acid	-0.74	-1.73	-1.46
Citric acid	0.27	1.03	3.08	Gluconic acid	-0.87	0.61	-0.30	Fructose 6-phosphate	-0.81	-1.48	-1.48
β-cyanolananine	0.25	-1.64	2.64	Octadecanoic acid	-0.78	-1.79	-0.44	Valine	-0.45	1.71	-1.49
Aspartic acid	0.23	2.23	-0.45	Ornithine	-0.49	-0.39	-0.59	Putrescine	-0.32	-0.59	-1.62
Glutamic acid	0.68	1.04	2.11	Malic acid	-0.20	-0.80	-0.59	Inositol	1.51	0.46	-1.68
Glutathione	1.47	1.60	1.74	Alanine	-0.14	-0.84	-0.61	L-Serine	-0.67	1.40	-1.70
Homoserine	1.76	0.30	1.33	Proline	-0.65	-1.02	-0.62	N-Acetylproline	-0.75	1.24	-1.81
Succinic acid	-1.14	0.82	1.27	meso-Erythritol	-0.64	0.51	-0.75	2-oxo-Glutaric acid	-2.15	-1.30	-0.49
Arginine	0.08	0.00	1.05	D-Xylose	-0.07	0.44	-1.00	Sucrose	-0.28	-2.19	-1.18
Agmatine	1.71	1.19	1.04	D-Maltose	0.58	-1.63	-1.02	GABA	-0.73	-1.17	-1.91
D-Trehalose	1.53	1.00	1.00	DL-Isocitrate	0.23	-0.65	-1.05	Glucose-6-phosphate	-1.55	-2.18	-2.20
N-Formyl-glycine	0.03	0.52	0.81	D-Ribose	-0.35	0.28	-1.07	Glycine	-0.72	0.37	-2.27
Proline	-0.79	1.63	0.70	Asparagine	-0.67	1.09	-1.13	Glutamine	-0.71	2.14	-2.57
β-Alanine	0.29	1.19	0.54	DL-Glyceric acid	-1.02	-2.00	-1.19	Glutaric acid	-2.34	-3.44	-2.82
Fumaric acid	0.17	1.71	0.51	Isoleucine	-0.92	1.33	-1.20	Hydroxyproline	-5.14	-2.74	-4.87
N-Acetyl-Glutamate	0.36	0.70	0.34	Lysine	-0.22	0.59	-1.33	5-oxo-Proline	0.95	1.07	-5.55

GC-MS分析により同定された化合物の相対含有量について、遺伝子組換え体(R16, R34, R38)と非組換え体(NT)間のt検定の結果を示す。表には算出された検定統計量が示されている。有意差は有意水準1%未満を(■)で、5%未満を(□)の色で表した。

LC-LIT-TOF/MSによるステロイドアルカロイドの分析

α-ソラニンとα-チャコニン

はステロイド類
似の骨格をもつソラニジンに3つの単糖がグリコシド結合したもので、ナス科の植物に含まれる神経毒性を示す化合物である。これらは、バレイショの表皮や芽に特に多く含まれ、虫害や

高温などのストレスに応答して増加することが知られている。これらを、LC-LIT-TOF/MS 法により定量した結果、*RKN* 遺伝子組換え系統において、有意な増加は見られず、含有量についても文献値^(5, 6)の範囲内であった (Table 3)。

Table 3. 供試したバレイショ塊茎中の α -ソラニンおよび α -チャコニンの含量

Strain	α -Solanine	α -Chaconine
NT	44.5 \pm 2.4	44.3 \pm 2.5
R16	50.8 \pm 10.7	28.4 \pm 4.8
R34	35.2 \pm 2.8	36.2 \pm 12.2
R38	40.8 \pm 17.8	26.8 \pm 7.1

($\mu\text{g}/\text{mg}$ FW)

D. 考察

ネコブセンチュウ病耐性遺伝子組換えバレイショと非組換えバレイショ塊茎を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。主成分分析の結果では、3系統の組換え体 (R16, R34, R38) と非組換え体 (NT) の間で代謝物の蓄積の違いを示唆する明確な差は検知されなかった。

GC-MS による非ターゲット型メタボローム解析によって、組換え体 R38 で有意に含量が増加した化合物 (尿素, ピログルタミン酸) が存在することが明らかになったが、他の2つの組換え体系統 (R16, R34) については含量に有意な差がなかった。尿素の生合成経路に含まれるアスパラギン酸, グルタミン酸, オルニチンの含量については有意な差が認められないので、この増加の要因は不明である。ピログルタミン酸は D-グルタミン酸代謝経路に関わり、グルタミン酸を介してシアノ化アミノ酸代謝経路など多くの代謝経路に関係する。R38 系統ではグルタミン含量が有意に減少していることから、ピログルタミン酸含量の変化に関連があるのかもしれない。しかし、導入された *RKN* 遺伝子の機能

は明らかではなく、尿素, ピログルタミン酸含量の増加が導入遺伝子の機能に関わるかどうかは不明である。さらに、組換え体の3系統の間でも代謝物蓄積に差が見られたことから、個体差, 生育環境の差や収穫後の保管条件などの違いによる影響なのかもしれない。

第3世代遺伝子組換え作物の実質的同等性評価の基盤整備として、作物固有のメタボロームの変動幅を統計的に把握することが重要である。そのためには、検定対象作物において、品種, 生育条件, 保管条件などが異なる試料を揃えて広範なメタボローム解析を実施する必要がある。

参考文献

- 1) Oikawa A., Nakamura Y., Ogura T., Kimura, A., Suzuki, H., Sakurai N., Shinbo Y., Shibata D., Kanaya S., Ohta D.: Clarification of Pathway-Specific Inhibition by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance/Mass Spectrometry-Based Metabolic Phenotyping Studies. *Plant Physiol*, 142, 398-413 (2006)
- 2) Rossner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R.N., Willmitzer L.: Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J*, 23, 131-142 (2000)
- 3) Dobson G., Shepherd T., Verrall SR., Conner S., McNicol JW., Ramsay G., Shepherd VT., Davies HV., Stewart D.: Phytochemical diversity in tubers of potato cultivars and landraces using a GC-MS metabolomics approach. *J Agric Food Chem*, 56, 10280-10291 (2008)
- 4) Galindo F.G., Dejmek P., Lundgren K., Rasmusson A.G., Vicente A., Moritz T.:

Metabolomic evaluation of pulsed electric
field-induced stress on potato tissue.
Planta 230, 469-479 (2009)

- 5) Shakya R., Navarre D. A. : LC-MS analysis of
solanidane glycoalkaloid diversity among
tubers of four wild potato species and
three cultivars (*Solanum tuberosum*). *J*
Agric Food Chem 56, 6949-6958 (2008)
- 6) Krits P., Fogelman E., Ginzberg I. : Potato
steroidal glycoalkaloid levels and the
expression of key isoprenoid metabolic
genes. *Planta* 227, 143-150 (2007)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と
リスクコミュニケーションに関する研究
分担研究報告書（平成 22 年度）

遺伝子植物のアレルギー性評価並びにプロテオーム解析

研究分担者 手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

研究要旨

平成 22 年度は、第 3 世代バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関するアレルギー性評価並びにプロテオーム解析に関する調査研究として、(1)遺伝子組換えジャガイモを用いてアレルゲンを含むタンパク質の網羅的解析手法の検討、(2)動物を用いる組換えジャガイモのアレルゲン性の検討、(3)アレルゲン予測の解析法の検討並びにアレルゲンデータベース(ADFS)のデータの更新、(4)発現タンパク質の品種間でのばらつきを調べるための 2D-DIGE による網羅的解析を行った。具体的には、(1) RKN(Root-knot nematodes)抵抗性遺伝子を導入したジャガイモと非組換えジャガイモの塊茎を用いて、アレルゲンを含むタンパク質の 2D-DIGE 法による比較検討を行い、遺伝子組換え (RKN) ジャガイモは非組換え (NT) ジャガイモに比べて、cysteine proteinase inhibitor (Sola t 3) や aspartic proteinase inhibitor (Sola t 2) の発現の増加が観察された。一方、multicystatine は、発現が減少していた (2) 食物アレルギー動物モデルマウスを用いて、RKN 遺伝子導入ジャガイモと非組換えジャガイモの感作を行い、両者のアレルゲン性について比較検討を行った。BALB/c マウスを用い、溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、組換えジャガイモ並びに非組換えジャガイモ塊茎抽出物の経口での感作、経口での惹起を行ったところ、アレルギー反応に関与する抗原特異的 IgG1 抗体産生及びアナフィラキシー症状に両者で同等と考えられた通常の摂食条件に比べて食物アレルギーの摂食条件ではパイエル板および腸管膜リンパ節の IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-21 の分泌量が減少したことから Th1、Th2 および濾胞ヘルパー T 細胞 (T_H) の分化が抑制されていることが示唆された。(3) アレルゲン予測の解析法の検討では、エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討を行い、既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片 (AUF) ピークをエピトープ候補とし、その中からアレルゲンのエピトープの物理的特徴の解明を行う手法の検討を行った。また、ADFS のアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行い、新たに 17 種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、エピトープ既知のアレルゲンの数は 98 種となった。(4) 発現タンパク質の品種間での差を調べるための 2D-DIGE による網羅的解析では、コメ 10 品種を用いた品種間の差に関するデータの蓄積を行った。

協力研究者

中村亮介、中村里香 (国立医薬品食品衛生研究所)
美宅成樹 (名古屋大学工学部)
近藤康人 (藤田学園大学坂文種報徳会病院)
新藤智子 (食品薬品安全センター泰野研究所)

A. 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。安全性評価の国際的動向としては、1999 年から 2003 年にかけて、コーデックス (Codex)

食品規格委員会 (国連食糧農業機関 (FAO) と世界保健機関 (WHO) 合同設立国際政府間組織) では、バイオ食品特別部会 (TFFBT) が設置され、バイオ食品について必要な基準、指針あるいは勧告を策定することとなり、2003 年 7 月にコーデックス総会で採択された「組換え DNA 植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」¹⁾ (ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/al03_34e.pdf) で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付されている。主な評価項目は、(1)新規産生タンパク質と、既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性 (特にペプシン抵抗性) 並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清または標的患者血清を用いる新規産生タンパク質に対する IgE 抗体の存在の有無のス

クリーニングがあげられ、検討項目として、動物モデルの使用の推奨等が述べられている。また、国内においては、組換え食品及び食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになり、食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準が平成16年1月に作定された。

さらに、2008年の第31回コーデックス総会で、「組換えDNA動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」、また、「栄養または健康に資する組換えDNA植物由来食品の安全性評価」の原案が最終的な合意が得られた。生産者のメリットを考慮した第1世代バイオテクノロジー応用食品に加え、第2世代の消費者のメリットも考慮したモダンバイオテクノロジー応用食品についても実用化が現実のものとなりつつあり、さらに環境への適応を考慮した第3世代遺伝子組換え作物も開発が進んでいる。

本分担研究では、第3世代遺伝子組換え作物の安全性評価の中で、遺伝子組換え体のアレルギー性評価並びのプロテオーム解析を担当し、第3世代遺伝子組換え作物のアレルギー性についての安全性評価のあり方、更には網羅的解析技術の安全性評価への応用の可能性について検討することを目的とする。具体的には、(1)遺伝子組換えモデル体を対象とし、アレルギー蛋白質の量的、質的変動を網羅的に解析する手法の導入、(2)食物アレルギー動物モデルを用いた組換え食品のアレルギー性の検討、(3)エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討及びアレルギーデータベース(ADFS)の充実を図ることを目的に研究を行う。

平成22年度は、(1)遺伝子組換えジャガイモを用いてアレルギーを含むタンパク質の2D-DIGE法による量的、質的変動の解析、(2)動物を用いる組換えジャガイモのアレルギー性の検討、(3)アレルギー予測の解析法の検討並びにADFSのデータの更新、(4)品種間の差を知るための発現タンパク質の2D-DIGEによる網羅的解析をとりあげ、研究を進めた。具体的には、

(1) RKN(Root-knot nematodes)抵抗性遺伝子を導入したジャガイモと非組換えジャガイモの塊茎を用いて、アレルギーを含むタンパク質の2D-DIGE法による比較を行い、量的、質的変動の解析を行った。

(2)動物を用いるアレルギー性の検討では、マウスを用いる経口感作、経口惹起のメカニズムについて更なる検討を加えるとともに、RKN抵抗性遺伝子導入ジャガイモと非組換えジャガイモの感

作を行い、両者のアレルギー性について比較検討を行った。

(3) アレルギー予測の解析法の検討では、(i)新規導入タンパク質のアレルギー性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することを可能にすることを目的として、既知のアレルギーに特徴的なアレルギーユニーク断片(AUF)のインデックスとその中からアレルギーのエピトープの物理的特徴の解明を行う手法の検討を行った。(ii)新規統合型アレルギーデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)に関しては、アレルギー並びに、エピトープ情報の更新を行った。

(4)発現タンパク質の2D-DIGEによる品種間での差を知るための網羅的解析では、コメ10品種を用いた検討を行った。

B. 研究方法

(1) 遺伝子組換えジャガイモアレルギーを含むタンパク質の量的、質的変動の解析手法の検討

(i) Non-GM 及び GM ジャガイモ塊茎タンパク質の抽出

遺伝子組換え(TG)ジャガイモには、CaMV(35S)プロモーターでドライブしたRKN抵抗性遺伝子をアグロバクテリウム法により導入したジャガイモを用いた。また、タンパク質発現量の比較用に、非組換え(Non-TG; NT)ジャガイモ7個体を用いた。これらのジャガイモはすべて、筑波大学・菊池博士らによって作製された。TGジャガイモは、塊茎におけるRKN抵抗性遺伝子の発現量から、発現量の低い9個体(RKN low)と発現量の高い9個体(RKN high)の2群に分類した。ジャガイモタンパク質の抽出は、ジャガイモ1g当たり5mLの細胞溶解バッファー(30mM Tris, 2M thiourea, 7M urea, 4% CHAPS)中で、Polytron(Kinematica社)を用いてホモジナイズし、10,000rpm, 10minで遠心後、沈殿を取り除いた。試料は使用時まで-80°Cで保存した。

(ii) 2D-DIGEによるタンパク質の網羅的解析

試料溶液中のタンパク質濃度を2-D Quant Kit(GE Healthcare社)にて測定し、RNK low, RNK high, NT各個体から抽出したジャガイモタンパク質20µgを200pmolのCy3あるいはCy5で標識し、4pmolのlysineで標識を停止した。内部標準として、全25個体から抽出したジャガイモタンパク質を等量ずつ混合し、Cy2で標識したものを用いた。Cy2で標識した内部標準とCy3あるいはCy5で標識したサンプルを混合し、等量の2×サンプルバッファーおよび膨潤バッファーを加えて250µlとし、Immobiline Drystrip(pH 3-10 NL, 13cm long, GE Healthcare社)に終夜膨潤させた。1

次元目の等電点電気泳動は、膨潤後の Drystrip を IPGphor isoelectric focusing system III (GE Healthcare 社) の説明書に従い、500V で 4 時間、1000V で 1 時間、8000V で 4 時間、20°C 下で行った。等電点電気泳動終了後の Drystrip を 0.5% (w/v) DTT を含む平衡化バッファー中で還元後、4.5% (w/v) ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファー中で SH 基の保護を行った。平衡化後の Drystrip を 10-20% アクリルアミドゲル (DRC 社) 中で 2 次元目の SDS-PAGE により分離し、Typhoon9400 (GE Healthcare 社) を用いて Cy2 (488nm/520BP40) Cy3 (532nm/580BP30) および Cy5 (633nm/670BP30) の蛍光を検出した。取得した蛍光イメージは Image Quant TL (GE Healthcare 社) にて解析するエリアを切り出し、Decyder Software ver. 6 (GE Healthcare) にて蛍光発現差異解析を行った。各サンプルの Cy3 あるいは Cy5 蛍光強度を内部標準サンプルの Cy2 蛍光強度で補正し、各スポットの TG/NT 比の平均値を求めた。ANOVA 検定により $p < 0.05$ で有意差が認められたスポットについて、基準群を NT とした Dunnett 検定を行い、NT 群に対して 2 倍以上の発現差異がみられたスポットを抽出した ($p < 0.05$)。

発現差異が認められたタンパク質の同定には、ジャガイモタンパク質 (100 μg) を 2 次元分離した後、アクリルアミドゲルを Silver Stain for Mass Spectrometry (Thermo scientific 社) を用いて染色し、相当するスポットを切り出した。切り出したゲルは脱色した後、50%アセトニトリル・25 mM 重炭酸アンモニウム溶液で脱水し、乾燥させた。乾燥したゲルにトリプシン溶液 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin Gold-Mass Spec Grade [Promega 社], Protease max [Promega 社]) を加え、37°C で 2 時間ゲル内消化を行った。消化ペプチドを α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA, Sigma-Aldrich 社) と混合し、4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて、トリプシン消化ペプチドの MS スペクトルおよび MS/MS フラグメントイオン質量を取得した。タンパク質同定のサーチエンジンには Mascot MS/MS ion search (Matrix Science 社) を用い、NCBI nr タンパク質データベース (*Solanum tuberosum*) 内での相同性検索を行った。

(2) 食物アレルギー動物モデルの開発

(実験 1) 実験には 7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、媒体対照 (Vehicle)、非組換えジャガイモ (NG)、組換えジャガイモ (GM)、陰性対照としてペプシン (PEP) および陽性対照として卵白アルブミン (OVA) 投与群を 6 匹/群で設定した。非組換えあるいは組換えジャガイモ 1 g に対して 3 mL のリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) を加えてホモジネートした後、4°C 下で 1.5

時間、攪拌した。ホモジネートを 4°C 下、12000 g で 30 分間遠心分離した上清を限外ろ過膜で濃縮して得た抽出液に、等量のリノール酸/大豆レシチン混合液 4:1 (LL) を加えて乳化し、NG 群あるいは GM 群に用いた。Vehicle、PEP および OVA 群の媒体は、PBS と LL の乳化液とした。いずれの群も 2 回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム (SA) 0.3 mg/匹を併用下、それぞれの蛋白質 0.8 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。感作 3 週間後に各蛋白質 4 mg/0.4 mL LL/匹の割合で経口投与して惹起 (1 回目) した。さらに、2 週間後、卵黄レシチンを用いた LL を媒体として 8 mg/0.4 mL/匹の割合で経口投与して惹起 (2 回目) した。惹起後 30 分間に観察されるアナフィラキシー症状の強さにスコアをつけ、1 匹のマウスが示した症状の最大スコアをその個体のスコアとした。各投与群間の差は Mann-Whitney の方法で検定した。また、2 回目の経口惹起の 6 日後に採血し、血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で測定した。

(実験 2) 7 週齢の雌性 BALB/c マウスに SA 併用下、生理食塩液と LL の乳化液媒体 (OVA/LL+SA) あるいは生理食塩液媒体 (OVA/S) を用いてそれぞれ OVA 1mg を経口投与した。OVA の経口投与後 3 および 6 時間に両群 3 匹のマウスからパイエル板および腸管膜リンパ節を取り出し、コラゲナーゼ処理によって細胞液を調製した。また、OVA を投与しない無処置マウス (Naive) 3 匹からもパイエル板および腸管膜リンパ節の細胞液を調製した。各細胞液から CD4 ネガティブセレクションキット (インビトロジェン) を用いて精製した CD4⁺ 細胞 8×10^4 個に同数の T 細胞活性化ビーズ (ダイナビーズ) を加え、5%CO₂、37°C 下 4 日間培養した。培養上清中に分泌された IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17 および IL-21 を ELISA で測定し、OVA/LL+SA 群のサイトカイン分泌量を Naive および OVA/S 群と比較した (t 検定)。

(3) アレルゲン予測の解析法

(i) タンパク質のアレルゲン性のバイオインフォマティクス手法による予測

新規に導入したタンパク質のアレルゲン性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することは非常に重要な課題である。アレルゲンであるタンパク質とアレルゲンでないタンパク質をアミノ酸配列から高精度に判別するには、3 つの段階が必要である。第 1 に、判別システムを作るための質のよいデータセットを用意すること、第 2 に、アレルゲンのエピトープとなる配列の特徴をつかまえること、第 3 に、特徴を用いて予測のシステムを開発することである (図 1)。

現在は第 2 の段階で研究が一定の進展を見せているが、バイオインフォマティクス (生物系の計算科学) の研究に特徴的な研究の進め方をする必

要があることが分かってきた。つまり、(問題の一般化)と(個別問題の解決)を交互に繰り返すことによって、より精度の高い予測システムへの高めていくことが有効である。これまでの解析によってアレルゲンのアミノ酸配列だけに見られるセグメントの付近でアミノ酸がどのように分布しているかが明らかにすることができた(AUFインデックスの開発)。そして、AUFインデックスを用いて任意のアミノ酸配列に対して、アレルゲンだけに見られるセグメントらしい部位を抽出することができた(AUFプロット)。もしAUFプロットで選択された領域がエピトープならば、予測システムとして用いることができるのだが、このピークはタンパク質立体構造の外側にあり、比較的揺らぎの大きい部位に相当しているということが分かってきた。従って、一般化されている問題を、もう一度個別化することが必要となってきた。今年度は、AUFプロットのピークをエピトープの候補とし、その中からアレルゲンのエピトープらしいセグメントの物性的特徴をつかまえ、それを用いて最終的にはエピトープ予測を可能にすることを目的として、アレルゲンだけでなく色々な結合様式のタンパク質についてのアミノ酸配列を検討した。

(ii) 新規統合型アレルゲンデータベース

(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新について

2009年6月から2010年5月の間にNCBI PubMedに収載された論文のうち、キーワード検索によりエピトープ配列決定に関するものを抽出し、ピアレビューを行ってエピトープ情報を報告していると判断された文献に記載されているエピトープ情報をADFSのデータに追加した。具体的には、8報の論文から17種のアレルゲンについて、総エピトープ数127の情報を追加した(表1)。本年度のアレルゲンおよびエピトープ情報更新作業により、アレルゲンおよびイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は1520となった。エピトープ既知のアレルゲン数は98種となった。

また、低分子量のアレルゲンに関する情報がまとめられたデータベースというものは2010年10月現在ウェブ上には存在せず、わずかに「AllAllergy」というDr Harris Steinmanらによる低分子・高分子を問わない形式のデータベースがあるのみである(<http://www.allallergy.net>)。

AllAllergyには2010年10月現在5226種のエントリーが登録されているが、その中には、動物名や総称など、低分子アレルゲンデータベースに収載するにはふさわしくないエントリーが多数含まれている。そこで、次の方法によりデータを精

査・選別した。

1) AllAllergyの全データをHTMLでダウンロードし、Excelファイル形式に変換(5226件)。

2) 一般名称や動植物名などのエントリーを削除(1906件)。

3) AllAllergyのDescription2種(IGE AND IMMUNEおよびNON IMMUNE)がともに「NilまたはUnknown」であるものを削除(1468件)。

4) AllAllergyのIGE AND IMMUNE:欄に、アレルギー・免疫系の関与を疑わせる記述がないエントリーを削除(918件)。

なお、上記4)の作業時に、NCBI等の外部データベースから、CID(compound ID)やCAS番号などの情報を可能な限り取り入れた。以上の作業を図示すると、図2のようになる。この暫定版データセットを元に、来年度、低分子アレルゲンデータベースのインタフェース構築およびウェブ上への公開を行なう。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種間での差を知るための網羅的解析

生物資源研究所より購入した10種(日本種6種 Nipponbare, Koshihikari, Sasanishiki, Akitakomachi, Hitomebore, Hinohikari、インディカ米1種 Kasalath、タイ米1種 Bleiyo、カリフォルニア米1種 Rexark、中国米1種 Cho-ko)の10種のコメの品種を用いて、それぞれ玄米を粉碎し、1N NaClで抽出し、抽出液中のタンパク質濃度をあわせて、2次元電気泳動用のサンプルとした。25ugのタンパク質を2-D Clean-Up Kitで精製後、日本晴は、内部標準品用としてCy2で標識し、一方、測定用として日本晴を含む10種の米をそれぞれCy3またはCy5で標識した。3種の蛍光剤で標識したコメ抽出タンパク質を等量混合し、溶液をImmobiline Drystrip (pH3-10 NL, 長さ13 cm)に付与した。Drystripを膨潤した後、1次元の等電点電気泳動は、20℃で、500 V, 4 hr; 1000 V, 1 hr; 8000 V, 4 hrの順で行い、次いで、stripを平衡化buffer(100mM Tris-HCl [pH8.0], 6M urea, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS) containing 0.5% (w/v) DTTで平衡化後、2次元目は、10-20%のグラジエントゲル(DRC Co Ltd)を用いたSDS-PAGEを行った。2次元電気泳動後、蛍光強度は、Typhoon 9400画像解析装置(GE Healthcare社)にて、Cy2, Cy3, and Cy5の蛍光色素をそれぞれ、520nm-bandpass (520BP40), 580nm-bandpass (580BP30), 670nm bandpass (670BP30)を用いて測定した。それぞれの蛍光色素標識で得られたスポットが一致するものか否かは、Decyder software version 6 (GE Healthcare)にて決定した。

C. 研究結果および考察

(1) 遺伝子組換えジャガイモタンパク質の2D-DIGEによる量的、質的変動の解析手法の検討

遺伝子組換え (TG; RKN low, RKN high)、非組換え (NT) ジャガイモの代表的な Cy 染色パターンを図3に示した。黄色に見えているスポットは2サンプル間での発現量が同等であるスポットを示している。赤色のスポットは TG ジャガイモでの発現量が NT ジャガイモの発現量よりも多いスポットを、緑色のスポットは逆に NT ジャガイモの発現量よりも少ないスポットを示している。Decyder ソフトウェアによりスポットのマッチングを行い、再現良く得られた400スポットのうち、TG/NT 蛍光比の平均値 (av. Ratio) が2以上あるいは1/2以下となるものを抽出した。NT 群に対するタンパク質発現差を Dunnett 法により検定したところ、RKN low 群では35スポットが、RKN high 群では31スポットが NT 群に比べて2倍以上発現量が変動していた ($p < 0.05$ 、図4、表2)。これらのスポットタンパク質の発現量は、RKN low 群と RKN high 群のどちらも同様の発現変動を示した。

NT 群に比べて TG ジャガイモで発現量が変動していたタンパク質スポットについて、アクリルアミドゲルから対応するスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化したペプチド断片の MS/MS 解析を行った (表2)。その結果、発現変動を示した37スポット中、16スポットのタンパク質を同定することができた。NT 群と比較して RKN low 群、RKN high 群ともに発現が増加していたタンパク質スポットからは、cysteine proteinase inhibitor, cold inducible protein, aspartic proteinase inhibitorなどが同定された。NT 群よりも発現が減少していたタンパク質からは、multicystatinが同定された。RKN 耐性遺伝子がコードするタンパク質の機能は明らかとなっていないが、本研究での RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモと野生型のジャガイモのタンパク質発現差異解析の結果、RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモで発現が増加していた cysteine proteinase inhibitor や aspartic proteinase inhibitor はそれぞれ Sola t 3, Sola t 2 として知られるジャガイモのアレルゲンであった。これらのアレルゲンタンパク質の発現増加が RKN 耐性遺伝子の導入によるものであるか、自然品種においても生育環境の違いによってみられるものであるかを今後、検討する必要があると考えられる。また、NT 群よりも発現が減少していた multicystatin も cysteine proteinase inhibitor ファミリーの1種であり、RKN 耐性遺伝子の機能との関連を解明する手助けとなる可能性があると思われる。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

(実験1) 2回目の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、Vehicle 群 0.2 および陰性対照とした PEP 群 0.5 に対して、陽性対照とした OVA 群は 2.7 と上昇した。NG 群と GM 群のスコア平均は 1.0 および 0.5 であり、両群のスコアは同程度であった。本実験では Vehicle と OVA 群間にのみ有意差 ($p < 0.05$) を認めた (図5)。血清中の抗原特異的 IgG1 抗体を ELISA で調べたところ、NG 群は 3/6 例、GM 群は 4/6 例のマウスに抗原特異的 IgG1 抗体が検出された (図6)。

(実験2) 食物アレルギー (OVA/LL+SA) あるいは通常 (OVA/S) の摂食条件で OVA を経口投与したマウスから3および6時間後に採取したパイエル板あるいは腸管膜リンパ節の CD4⁺細胞が分泌したサイトカイン図7あるいは図8に示した。3時間後に採取したパイエル板の CD4⁺細胞では OVA/S 群に比べて OVA/LL+SA 群の IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-21 の分泌量が有意に減少し、IL-2 以外は6時間ではさらに減少した。3時間後に採取した腸管膜リンパ節の CD4⁺細胞においても OVA/S 群に比べて OVA/LL+SA 群の IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-21 の分泌量が有意に減少したが、6時間では差はなくなった。

以上、マウスの食物アレルギーモデルを用いて、遺伝子組換えジャガイモおよび非組換えジャガイモの食物アレルゲン性を比較した。ジャガイモ抽出液 (蛋白質濃度: 0.8~2.0 mg/mL) を濃縮し、1匹あたり蛋白質 0.8 mg を週に2回の頻度で経口投与し、それぞれ蛋白質 8 mg (2回目) で惹起したが、アナフィラキシー症状は両群とも低かった。また、抗原特異的 IgG1 抗体価検出の頻度および抗体価も同レベルであったことから、遺伝子組換えジャガイモおよび非組換えジャガイモの食物アレルゲン性は同等であると考えられた。

また、通常の摂食条件に比べて食物アレルギーの摂食条件ではパイエル板および腸管膜リンパ節の IFN- γ 、IL-2、IL-4 および IL-21 の分泌量が減少したことから Th1、Th2 および濾胞ヘルパー T 細胞 (Tfh) の分化が抑制されていることが示唆された。Th2 細胞への分化誘導を伴った Th1 細胞への分化抑制は免疫反応を食物アレルギーへコントロールする要因と考えられるが、食物アレルギーの摂食条件では Th2 細胞への分化も抑制された。特にパイエル板での Th2 細胞および Tfh 細胞への分化抑制は経口投与後3時間に比べて6時間の細胞でより著明であり、摂食条件の影響を強く受けていると考えられた。Tfh は濾胞の胚中心において、B 細胞を記憶 B 細胞や長寿命の抗体産生細胞へと分化させる働きが知られており、パイエル板では IgA の産生に重要である。食物アレ

ルギーの摂食条件はIgA産生に影響を与えている可能性が考えられた。一方、食物アレルギーの摂食条件によってIL-10およびIL-17の分泌量に差はなく、TregおよびTh17への分化への影響は認められなかった。食物アレルゲンの経口投与後短時間で腸管リンパ組織において認められたヘルパーT細胞分化抑制は、いくつかの免疫反応を経て食物アレルギー発症に寄与するものと考えられた。

(3) アレルゲン予測の解析法

(i) タンパク質のアレルゲン性のバイオインフォマティクス手法による予測

a) アレルゲンに特有な断片周辺の配列

アレルゲントタンパク質と非アレルゲントタンパク質については、かなりの数知られているので、そこからアレルゲンに特異的な配列を探索している。そこで3つのことを仮定して、データセットを準備した。(1) アレルゲンとIgEとの結合部位は、複数の断片からなっている。(2) 断片のうち少なくとも一つはアレルゲンに特有の断片である。(3) 結合に関与する断片は、何回も出現する。以上のことを満たす断片(3~8残基)をアレルゲンのタンパク質から抽出することで、8696個の断片を得た。

各断片の中心の周り前後10残基のアミノ酸分布を見たところ、ウェーブレット様の分布を示した。中心にピークを持ちその両サイドに浅い谷を持った分布である。この分布を示すアミノ酸は、電荷を持つアミノ酸(D、E、K)と小さなアミノ酸(A、G)である。これに対して、それと反転した分布(中心に谷がありその両サイドに低いピークを示す分布)を示すアミノ酸もあり、芳香族のアミノ酸(F、W、Y、H)とイオウを含むアミノ酸(C、M)およびイミノ酸(P)がそのようなアミノ酸である。それを用いると、各アミノ酸配列に対して、アレルゲンらしさを特徴づけるプロット(AUFプロット)を作成した。

AUFインデックスが高い領域は、アラニンやグリシンなどの高分子に柔軟性を与えるアミノ酸と、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジンなどの電荷を持った非常に親水性の高い残基が中心に分布し、周辺には芳香族のアミノ酸など大きく主鎖の自由度を制限するようなアミノ酸が分布していることを意味している。アレルゲンに特有な断片は、土台の上にふらふらした親水性のセグメントをつけたような形のところとなっていることになる。

b) AUFピークと立体構造及びエピトープ位置の相関

結合部位がどのような性質を持っているかを、AUFプロット、疎水性プロットを組み合わせ

解析してみると、図9に示した通りAUFピークでも比較的親水的な部分がエピトープと一致していることが分かった。また、AUFピーク的位置を二次構造の分布と比較してみると、AUFピークはおおむね二次構造の端に位置していることが分かる。立体構造解析による揺らぎの大きさとAUFピーク的位置を比較してみると、AUFピークの部位は、揺らぎの大きい部位に対応していることが分かる。つまり、AUFプロットによって、タンパク質の外側で二次構造の端ないしループ領域にある構造揺らぎの大きな部位を指定することができるということが分かった。ただ、色々なアレルゲンのアミノ酸配列に対してAUFプロットの検討を行い、そのピークだけでは高精度の予測は難しいことが分かった。AUFピークは多く、その中からエピトープを選択する必要がある。

アレルゲンとその抗体が結合することによって、アレルギー反応の引き金が引かれる。従って、最も基礎的なこととして、タンパク質間結合のメカニズムについての理解が必要である。タンパク質結合には、非常に強固な結合によって一つの複合体を形成する場合、反応時に一時的に結合する場合など、色々なタイプの結合がある。それぞれによって結合部位のアミノ酸配列に特徴があるはずであり、結合の強度と結合部位のアミノ酸配列の関係(物性分布の特徴)を詳細に検討することによって、アミノ酸配列だけから結合の特徴を分類できるようになると考えられる。その時に本研究で開発したAUFプロットのピーク部位における様々な物性分布を調べることで有効だと考えられる。本年度は、アレルゲンに偏ることなく、色々な結合様式のタンパク質についてのアミノ酸配列を検討した。その中で、アミロイドタンパク質は非常に興味深い特徴を示していた。アミロイドタンパク質は、構造変化を引き起こし、 β シートが強固に結合したアミロイドを形成する。元々の立体構造から構造変化するには、アミノ酸配列の中に最終構造(アミロイドの構造)に変化するためのシグナルが隠されているわけで、それをAUFプロットを軸として物性分布の特徴を検討してみた。その結果、正常構造では長い α ヘリックス構造であるセグメントのほぼ中心にAUFピークがあり、しかもその付近の疎水性がかなり高い疎水性を示していた。これに対して、比較的軟らかい結合をしていると考えられるアレルゲンのエピトープ付近のAUFピークではより親水的なセグメントとなっていた。これは、今後の研究を進める上で興味深いきっかけとなっていると考えられる。

(ii) アレルゲンデータベース (ADFS) の構築について

今年度の追加作業により、アレルゲン及びイソアレルゲンのアミノ酸配列情報は 1520 本となった。また、エピトープ情報は 17 種のアレルゲンについて線形及びコンフォメーションエピトープ情報を加えたため(表 1)、エピトープ既知のアレルゲンの数は 98 種となった。昨年同様、エピトープ情報を集積したアレルゲンデータベースとしては、現時点で世界最大の規模である。また、低分子アレルゲンデータベース構築のための準備作業を開始し、平成 23 年度のインタフェース構築及びウェブへの公開を目指す。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種間の差を知るための網羅的解析

結果としては、13 x13cmゲルを用いた二次元電気泳動で、コメの塩抽出物からおよそ 700 のスポットが分離された。日本晴で発現されているタンパク質を基準として、他の9種のコメのそれぞれのタンパク質発現量を比で表した時、日本晴と、日本コメ5種の間にタンパク質の発現量として大きな違いはなく、5倍を超えるまたは、1/5以下の発現量を示すスポットは、3スポット以下であったが、一方、他の4種の外国産のコメの場合は、5スポット以上となり、特に、Kasalath 29スポット、Bleiyo 23スポットと発現量に大きな違いがみられるスポットが観察された。このように、2D-DIGE法は、品種間のタンパク質発現量を定量的に比較する上で、有用であることが示された。また、2D-DIGEで変化のみられたタンパク質をトリプシン消化後、MALDI/TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems) で、MS (マス) スペクトル及びMS/MSフラグメントイオン質量を取得し、Mascot MS/MS ion search 検索エンジンを用い、NCBI Inr タンパク質データベース内での相同性検索を行うことにより、多くのスポットのタンパク質を同定することが可能であった。さらに、アレルゲンタンパク質にターゲットをあてたアレルゲノムの解析も可能で、現在、5種のアレルゲンにターゲットを絞った2D-DIGEによる解析法の複数機関による妥当性評価を検討している。

今後、第二世代の栄養改変など宿主の代謝系への影響を意図するもの、また、第三世代のように転写因子を導入することにより、環境耐性を付与した場合などの開発が進んでくることが予想され、非意図的に、宿主のアレルゲンタンパク質の発現に量的、質的変化の引き起こされることから、2010年にEFSAから、GMOに関するEFSAパネルの報告として、GM植物及び微生物のアレルゲン性評価のための科学的見解という文書がだされた²⁾。この中で、オミクス技術に関しては、プロテオ-

ムと標的血清スクリーニングをベースにしたアレルゲノム手法の導入、遺伝子組換え食品の比較対照としての品種間のばらつきを考慮したアレルゲンの含量に関する情報の必要性が、述べられている。今後、アレルゲンにターゲットを絞ったターゲットオミクスのひとつであるアレルゲノム手法の標準化をめざした研究、アレルゲンに関する情報の収集、データベース化が更に重要になってくるものと思われる。

また、アレルゲン解析以外のオミクス手法に關しても、開発されてくる GM 生物に対応したターゲットを絞ったオミクス技術の適用がケースバイケースで必要になってくるものと思われ、そのためのオミクス技術の妥当性評価、情報の蓄積が着実に行われてゆく必要があると思われる。

D. 結論

(1) RKN 耐性遺伝子導入組換えジャガイモタンパク質の 2D-DIGE による解析

2D-DIGE 法を用いて RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモと、非導入ジャガイモのタンパク質発現差異解析を行ったところ、RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモではアレルゲンタンパク質である cysteine proteinase inhibitor や aspartic proteinase inhibitor の発現も増加していた。一方、multicystatin は RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモでは発現が減少していた。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

BALB/cマウスを用い、溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、組換えじゃがいもびに非組換えじゃがいも塊茎抽出物の経口での感作、経口での惹起を行ったところ、アレルギー反応に關与する抗原特異的IgG1抗体産生及びアナフィラキシー症状に両者で違いはみられなかった。また、本実験系で用いたマウスを用いる経口感作の成立過程において、IL-21を産生する濾胞ヘルパーT細胞 (Tfh) の分化が抑制されていることが示唆された。

(3) アレルゲン予測の解析法では、

(i) タンパク質のアレルゲン性のバイオインフォマティクス手法による予測 -既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)ピークとアレルゲンのエピトープの物理的特徴の解明を行う手法の検討を行った。

(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の更新作業を行った。新たに17種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、アレルゲンデータセットの整備、検索に用いるアレルゲンのMotifの更新を行った。

(4) 発現タンパク質の2D-DIGEによる品種の差を知るための網羅的解析

2D-DIGE法を用いて10品種の国産、国外のコメ塩抽出タンパク質の発現量の定量的に比較を行い、2D-DIGEが有用な方法であることが示された。

E. 参考文献

- 1) http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/codex/code_x.html
- 2) EFSA GMO Panel: Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed., EFSA J. (2010) 8(7):1700, p1-p168

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 手島玲子: 遺伝子組換え農作物のアレルゲン性評価, 食品安全ハンドブック, 丸善, 東京(2010), p574-577
- 2) Asakawa N, Sakiyama N, Teshima R, Mitaku S. Characteristic amino acid distribution around segments unique to allergens. J. Biochem., 147, 127-133 (2010)
- 3) Nakamura R, Nakamura R, Nakano M, Arisawa K, Ezaki R, Horiuchi H, Teshima R.: Allergenicity study of EGFP-transgenic chicken meat by serological and 2D-DIGE analysis. Food Chem Toxicol. 48, 302-10. (2010)
- 4) Teshima R, Nakamura R, Satoh R, Nakamura R. 2D-DIGE analysis of rice proteins from different cultivars. Regul. Toxicol. Pharmacol. 58 (3 Suppl), S30-5 (2010).
- 5) Nakamura R, Satoh R, Nakamura R, Shimazaki T, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Kikuchi A, Watanabe KN, Teshima R. Immunoproteomic and two-dimensional difference gel electrophoresis analysis of *Arabidopsis dehydration response element-binding protein 1A (DREB1A)*-transgenic potato. Biol. Pharm. Bull. 33 (8), 1418-25 (2010).
- 6) Satoh R, Nakamura R, Komatsu A, Oshima M,

Teshima R. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants. Regul. Toxicol. Pharmacol., 59, 437-444 (2011)

- 7) 手島玲子, 中村亮介: 食品中のアレルゲンの予測, 日本食品衛生学会誌, 52, 1-9 (2011)
- 8) 手島玲子 非組換え植物の生物学的変化の評価とOmics技法の活用に関して、イルシー, 104, 4-8 (2011)

2. 学会発表

- 1) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 手島玲子 2D-DIGE法による玄米10品種のプロテオーム解析 日本食品化学学会第16回総会・学術大会 (2010.6)
- 2) 佐藤里絵, 児矢野聡, 高木加代子, 中村里香, 手島玲子 ソバ主要アレルゲンFag e 2のIgEエピトープの同定 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2010.11)
- 3) 中村里香, 佐藤里絵, 中村亮介, 島崎高嘉, 春日美江, 篠崎(山口)和子, 菊池彰, 渡邊和男, 手島玲子 Immunoproteomic and 2D-DIGE Analysis of *Arabidopsis DREB1A*-Transgenic Potato 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010.12)
- 4) 中村里香, 佐藤里絵, 手島玲子 赤米・黒米のアレルゲン発現プロテオミクス解析 日本薬学会第131回年会 (2011.3)
- 5) 中村亮介, 石渡亜耶乃, 樋口雅一, 中村里香, 川上 浩, 手島玲子 新しいアレルギー試験法 EXiLE法による加熱卵白アレルゲンのIgE応答性の解析 日本薬学会第131年会 (2011.3.)
- 6) 手島玲子 アレルゲン検査の現状と課題 第47回日本小児アレルギー学会 (2010.12.)
- 7) 手島玲子 Allergenicity of Genetically Modified Foods 2010 FIP-PSWC/ AAPS(2010 国際薬学会/米国薬学会合同会議) (2010.11)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

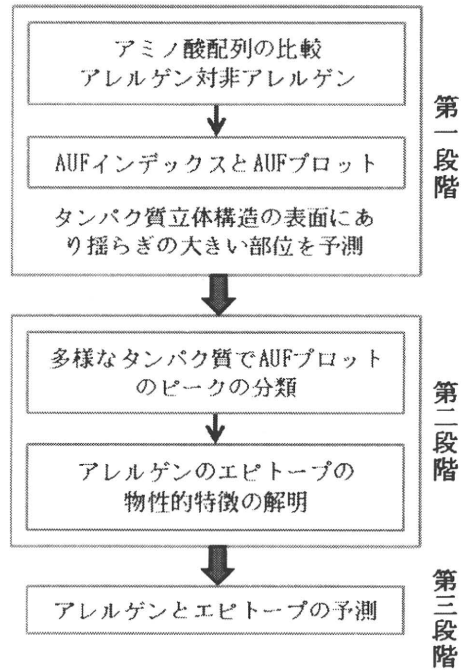


図1. アレルゲン予測への流れ

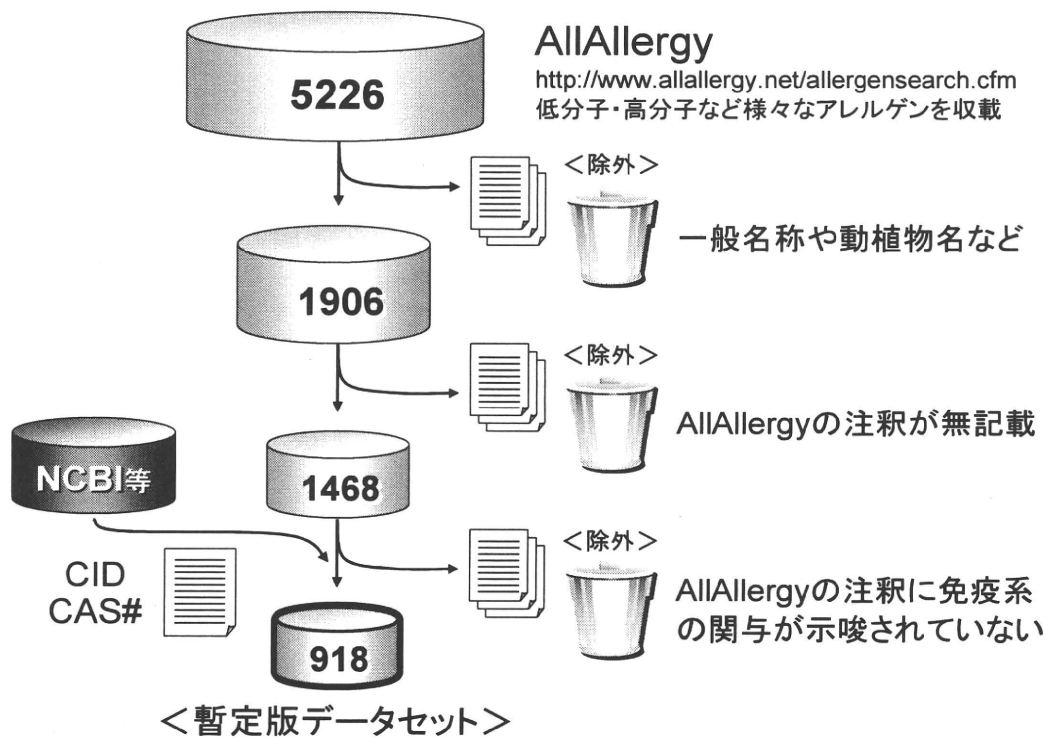


図2. 低分子アレルゲンデータベース構築のためのデータセット取得作業の概略

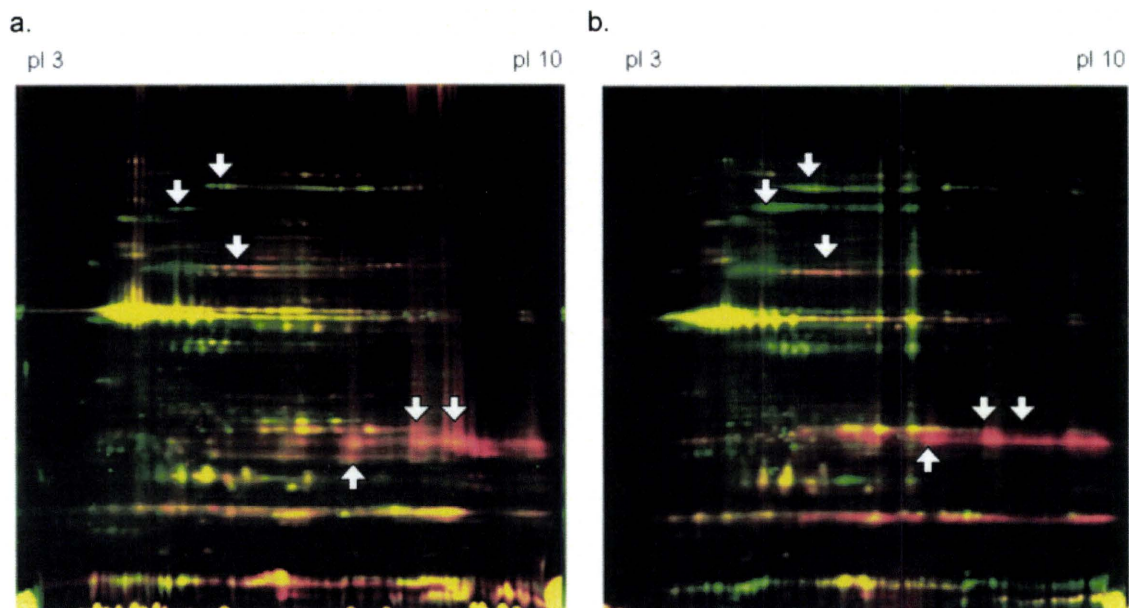


図3 2D-DIGE法により得られたRKN耐性遺伝子導入ジャガイモと野生型ジャガイモのタンパク質発現パターン代表例

RKN耐性遺伝子導入ジャガイモ (RKN low, RKN high) および野生型のジャガイモ (NT) から抽出したタンパク質をCy3/Cy5で標識し、混合して2次元電気泳動を行った。各群のタンパク質発現パターンの代表例を示した。2サンプル間で発現変動がみられたスポットを矢印で示した。

- a. 緑色 : NT,
赤色 : RKN low

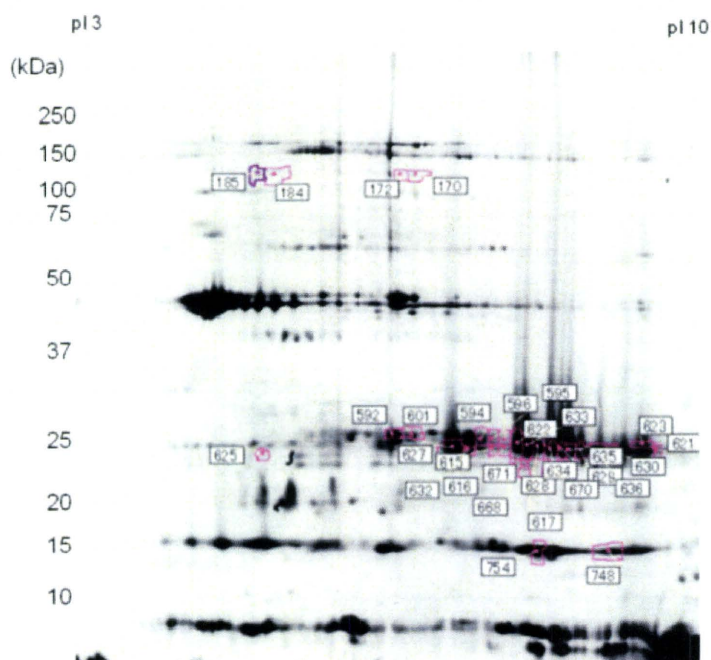
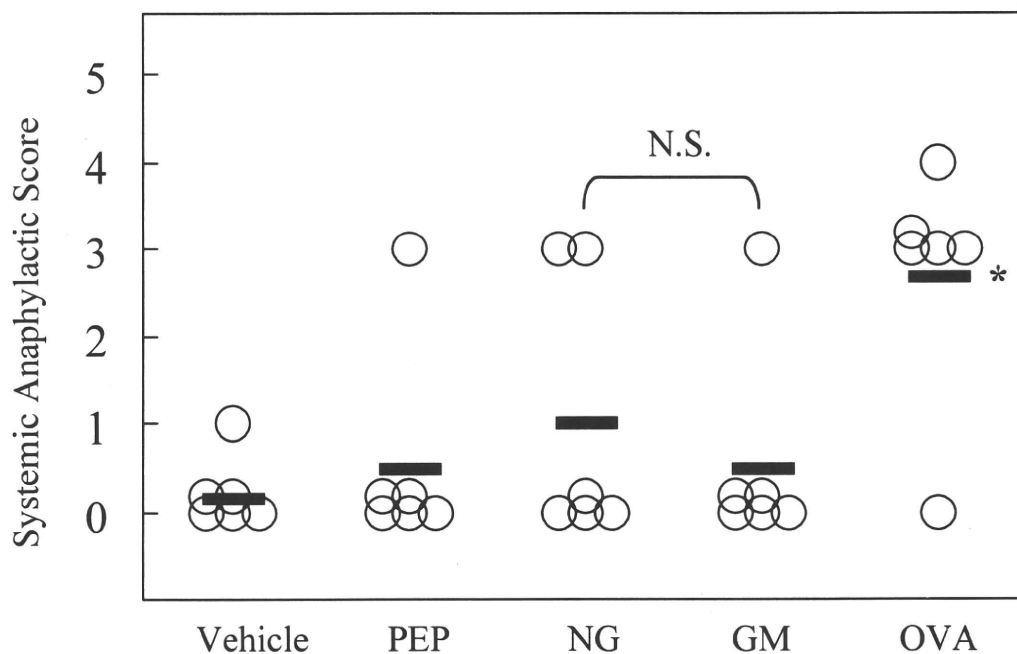


図4 2D-DIGE法によりRKN耐性遺伝子導入ジャガイモにおいて発現変動がみられたスポット

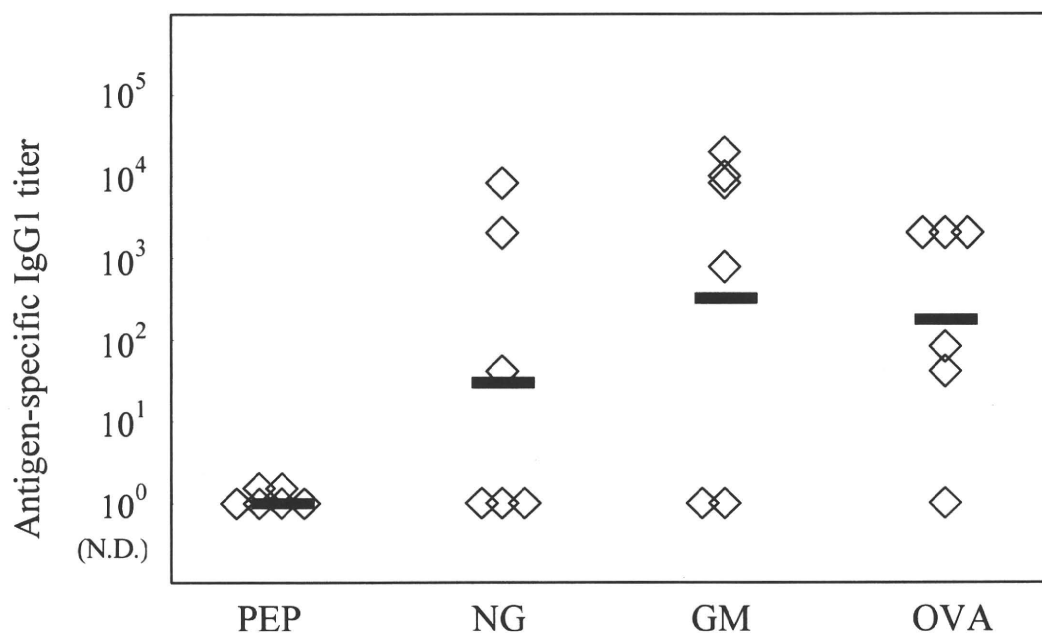
RKN high サンプルのタンパク質発現パターン (図 1b、赤色) を示した。2D-DIGE 解析の結果、RKN耐性遺伝子導入ジャガイモとNTジャガイモ間で発現変動がみられたスポットを赤丸で示した。スポット番号は表1と対応している。

表 2 2D-DIGE 解析の結果、RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモにおいて発現変動がみられたスポットの MALDI-TOF MS/MS によるタンパク質同定結果

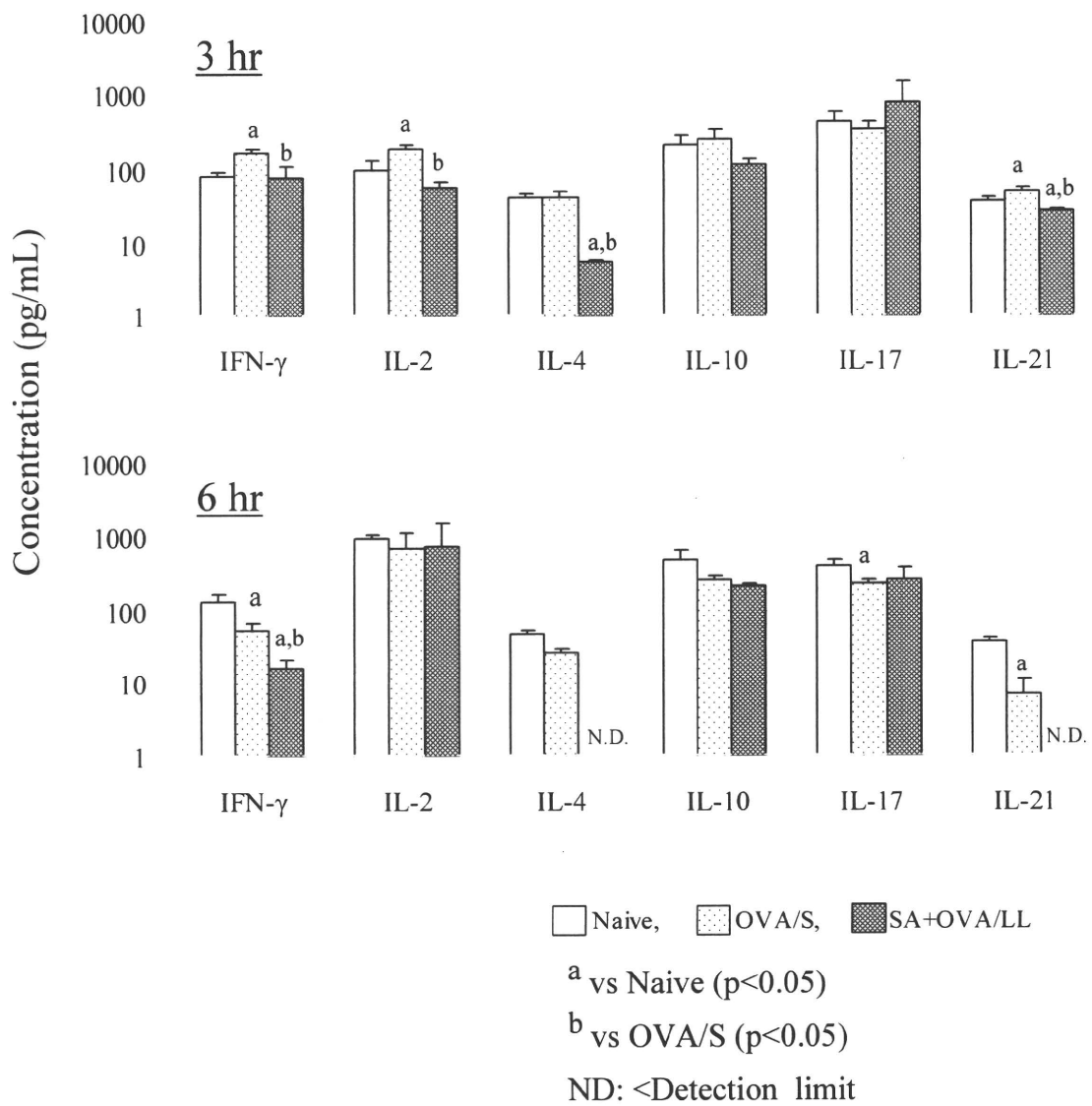
Master No.	Appearance	Av. Ratio: Low / NT	Av. Ratio: High / NT	1-ANOVA	Protein Hits	gi	MW (Da)	pI	score	sequence coverage	number of matched peptides
170	60 (72)	-2.23	-2.13	5.20E-09	not identified						
172	45 (72)	-3.07	-2.9	1.70E-08	not identified						
184	69 (72)	-7.36	-7.76	4.40E-16	multicystatin, PMC=crystalline cysteine proteinase inhibitor [N-terminal, fragment 10-5] [Solanum tuberosum]	544881	6959	4.55	60	32%	1
185	60 (72)	-6.02	-6.22	4.00E-13	multicystatin [Solanum tuberosum]	415591	86731	5.62	61	2%	2
416	54 (72)	-2.08	0.011		not identified						
588	54 (72)	2.67	2.71	2.10E-11	not identified						
592	51 (72)	2.23	2.23	1.20E-09	dehydroascorbate reductase-like protein [Solanum tuberosum]	76160951	23596	6.09	209	38%	6
594	63 (72)	2.13	2.01	9.40E-10	not identified						
595	57 (72)	2.49	2.2	5.30E-09	not identified						
596	57 (72)	2.45	2.28	1.40E-11	not identified						
597	45 (72)	2.31	2.25	4.40E-09	not identified						
601	51 (72)	2.04	2.24	1.70E-08	not identified						
602	66 (72)		2.1	7.80E-10	not identified						
615	57 (72)	2.58	2.65	1.90E-09	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	184	23%	3
616	57 (72)	2.31	2.23	4.00E-09	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	120	23%	3
617	48 (72)	2.94	2.74	4.00E-09	not identified						
621	54 (72)	2.52	2.27	1.30E-07	not identified						
622	51 (72)	2.41	2.56	7.40E-07	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	238	23%	4
623	60 (72)	2.94	2.82	4.40E-11	cysteine proteinase inhibitor 10 precursor	1575306	21234	7.57	349	41%	7
624	54 (72)	3.06	2.9	3.40E-07	not identified						
625	51 (72)	2.2	1.41	0.047	not identified						
627	54 (72)	2.01	1.93	1.10E-05	aspartic proteinase inhibitor [potato, Peptide, 220aa]	255215	24676	6.26	45	10%	2
628	51 (72)	2.58	3.16	2.90E-10	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	197	23%	4
629	63 (72)	3.25	3.13	8.40E-13	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	276	28%	5
630	57 (72)	2.48	2.31	1.90E-08	put. trypsin inhibitor [Solanum tuberosum]	21589	25008	6.99	298	21%	5
632	60 (72)	2.56	2.37	3.90E-09	not identified						
633	63 (72)	2.44	2.75	5.10E-10	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	221	23%	4
634	48 (72)	2.28	2.41	8.10E-08	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	150	23%	4
635	45 (72)	3.23	3.06	8.20E-09	PCPI 8.3=cysteine proteinase inhibitor [potatoes, tubers, Peptide, 180aa]	435816	20305	7.81	236	23%	4
636	66 (72)	3.08	3.04	8.50E-13	not identified						
668	63 (72)	2.06	1.76	1.50E-10	not identified						
670	54 (72)	2.6	2.3	2.80E-13	not identified						
671	57 (72)	2.35	1.99	2.40E-11	aspartic proteinase inhibitor [Solanum tuberosum]	21413	24124	7.51	332	37%	5
740	48 (72)	2.02	1.68	1.20E-05	not identified						
748	48 (72)	2.4	2.29	1.20E-10	cold inducible; similar to other osmotic stress induced gene products including: Tomato abscisic stress ripening protein 1 encode	435816	20305	6.45	112	26%	3
754	54 (72)	2.25	2.12	1.50E-08	proteinase inhibitor 1 PPI3A4 [Solanum tuberosum]	70779535	12061	4.91	203	0.42	4
756	60 (72)	2.05	1.79	1.20E-05	not identified						



☒ 5 Antigen-induced systemic anaphylactic scores at the 2nd challenge



☒ 6 A comparison of the serum level of Antigen-specific IgG1 antibody



☒ 7 Profiles of cytokines produced by cultured CD4⁺-T cells of Peyer's patches

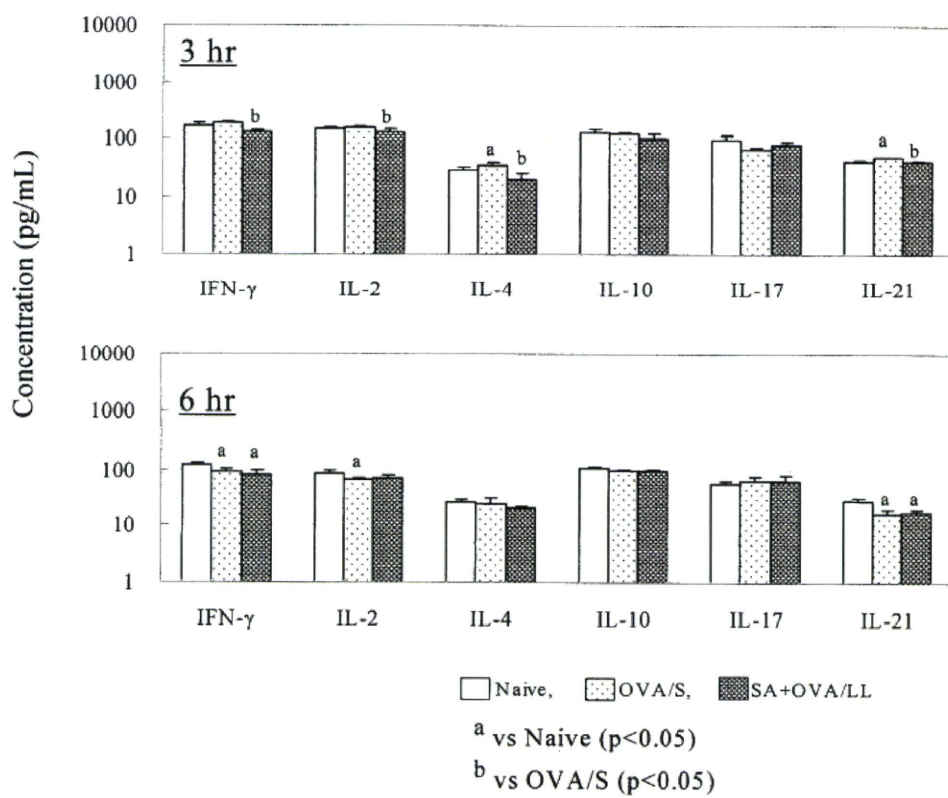


図 8 Profiles of cytokines produced by cultured CD4⁺-T cells of mesenteric lymph nodes

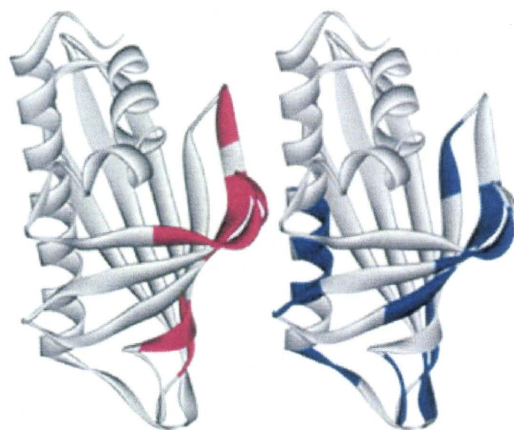


図 9. 花粉のアレルゲンの立体構造：(左) エピトープの部位、(右) AUF プロットのピーク (中間的疎水性)

組換え植物の検知技術の開発に関する研究

研究分担者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨

1. パパイヤ加工製品からのパパイヤ DNA 抽出精製法の検討と安全性未承認遺伝子組換え (GM) パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法の開発 パパイヤ加工製品から精製度の高いパパイヤ DNA の抽出・精製法を確立し、台湾産安全性未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法を開発した。**2. 中国産安全性未審査 GM コメの遺伝子解析の検討** 検疫所から提供された複数のコメ加工品に、害虫抵抗性を示す Bt トキシン遺伝子が組込まれた GM コメ Kemingdao (KMD) 系統の混入が確認された。その後、同加工製品の一部に新たにトリプシンインヒビター CpTI 発現カセットを検出したことを昨年度に報告した。本報告では、新たに CpTI 発現カセットを特異的に検知するコンストラクト特異的検知法の確立を行った。中国産 GM コメ混入の実態を明らかにするため、これまでに開発した一連の GM コメ検知法と併せて安全性未承認 GM コメを検出する解析方法の検討を行った。**3. GM トマトの検知法開発に関する研究** 国内で消費される主なトマト加工製品を中心に GM トマト混入の検査方法の確立と実態調査を行った。**4. 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発** 植物のゲノムには、対称 (CG, CNG) 及び非対称 (CHH) な配列のシトシン塩基にメチル化が観察される。本研究では、まず発芽前の種籾を取り上げ、稲の主要病害である白葉枯病の病原菌 *Xanthomonas oryzae* に抵抗性誘導活性を有するタンパク質 Xa21G のプロモーター領域を中心にメチル化パターンの解析を試みる。種子ゲノム DNA のメチル化のような後天的修飾のダイナミズムに関する基礎的な知見を収集し、そのパターンを応用した新規な染色体上の組換え遺伝子配列を検出する識別検知法を開発の可能性を探る。

協力研究者

中村公亮、濱岡志津子、山田千尋、牧山太樹、
坂田こずえ (国立医薬品食品衛生研究所)
橘田和美、真野潤一、高島玲於奈
(独) 農研機構 食品総合研究所)
大森清美 (神奈川県衛生研究所)
笠原正輝 ((独) 農林水産省消費技術センター)
吉松嘉代、河野徳昭 ((独) 医薬基盤研究所)
小関良宏、佐々木伸大 (東京農工大学)
名古屋博之 ((独) 水産総合研究センター)

A. 研究目的

現在、第 3 世代を含めた遺伝子組換え (GM) 食品の多様化が進んでいる。加工品に未承認 GM 食品の混入は未然に防ぐことが求められている。そこで本研究では、第 3 世代を含めた種々を流通阻止を監視するシステムの確立と、それらの検知技術の高度化及び新規検知技術の導入を検討した。

B. 研究方法

1. パパイヤ加工製品からのパパイヤ DNA 抽出精製法の検討と安全性未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法の開発

① 試料

生鮮パパイヤ及び各種パパイヤ加工製品は国内でインターネット販売されているものを使用した。非 GM パパイヤ Sunset 品種はハワイ・パパイヤ協会から提供されたものを使用した。

② パパイヤ加工製品の DNA 試料抽出前処理及び DNA 試料の精製

安全性未審査の GM パパイヤ (PRSV-YK) の検査法 (食安監発 0222 号第 3 号、平成 23 年 2 月 2 日) に従って、パパイヤ加工製品は、まず G2 緩衝液 (QIAGEN 製) 中でよく混合粉碎し、試料の調製を行った。DNA 抽出精製は、陰イオン交換膜タイプカラム Genomic-tip 100/G (QIAGEN 製) を用いて以下の改変法に従って行った。